Kapa Library Quantification Kit 操作方法ガイド
(Ion Torrent™用：KK4827, KK4838, KK4847, KK4857)

念のため、最初に下記のプライマー配列に合致するライブラリーかどうかご確認ください。

本キットに含まれるプライマー配列
Primer IT A　　: 5’ -CCA TCT CAT CCC TGC GTG TC-3’
Primer IT trP1 : 5’ -CCT CTC TAT GGG CAG TCG GTG AT-3’

1. 操作フロー（概要）および所要時間（目安）

2. 準備するもの

・Kapa ライブラリー定量キット
・サンプルライブラリー　1～6ライブラリー（シーケンスに使用するもの）
・PCR 用 蒸留水　50ml程度
・Tween 20　1ml程度
・10mM Tris-HCl pH8.0　10ml程度
・プレート遠心機
・1.5mlチューブ遠心機
・qPCR装置
・PCR Plate　1枚
・qPCR用シール　1枚　（またはqPCR用キャップ）
・その他、リアルタイムPCR装置に必要な消耗品等
・50ml遠心管
・1.5mlチューブ（ライブラリー数×4本）+α
・2.0mlチューブ　1本
・その他（ピペット、チップ、グローブなど）
　*オプション：8連チューブ（分注用リザーバー）⇒2ライブラリー毎に1ストリップ + マスターミックス用1ストリップ

3. 前準備

1）ライブラリー希釈液（10mM Tris-HCl pH8.0 + 0.05%Tween20）の調製

50ml遠心管に10mM Tris-HCl pH8.0 10ml とTween20 5μlを混合します。（6ライブラリー分調製する場合）

2）qPCRマスターミックスの調製

各試薬が溶解していることを確認し、使用前にはボルテックス混合してください。
開封後初回使用時には、マスターミックス5mlボトルに、プライマーミックス1mlを添加し、ボルテックス混合します。*1、*2

*1：ボトルに混合した日付を記載してください。
*2：ユニバーサルキット KK4827 では、ご使用になるqPCR装置により、ROX Dye の添加が必要な場合があります。下記をご参照のうえ、適切な試薬をボトルに添加してください。

Instrument	ROX Reference dye	添加量
ABI 5700, 7000, 7300, 7700, 7900HT, StepOne™, StepOnePlus™	ROX High	200μl
ABI 7500, ViiA™ 7 Stratagene Mx3000P®, Mx3005P™, Mx4000®	ROX Low	200μl

上記以外の装置は、ROX添加の必要はありません。

3) リバースピペッティング

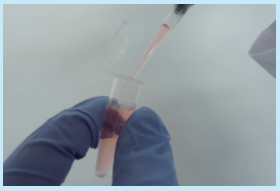
泡立ちやすい溶液や粘性の高い溶液をより高い精度でピペッティングによる分注をするためには、リバースピペッティングが有効です。
あらかじめ、操作方法をテストし、確認いただくことをお勧めします。

＜リバースピペッティング操作方法＞

① ピペットのピストンを2段目まで押し切ります。

2段目まで

② そのまま溶液を吸引します。

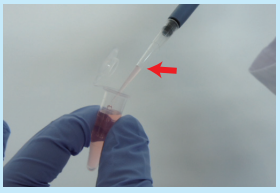


吸引量多い

③ 吐出の際は、1段目まで押して分注します。

1段目まで

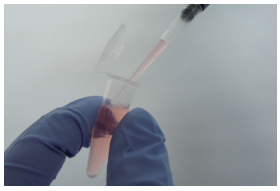
④ 吐出後も、チップ内には溶液が残っています（右図矢印）。連続分注の場合はそのまま続けて溶液を吸引します。



残液あり

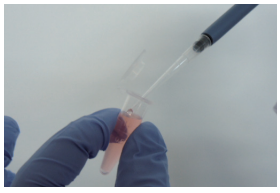
＜通常のピペッティング（参考）＞

1段目まで



吸引量少ない

2段目まで



吐き切り

4）プレートのレイアウト（配置）決定

予め、レイアウトを決めておきます。

STD：スタンダード
NTC：Non Template Control
Lib　：ライブラリー

＜配置例＞　プロトコールどおりn=3で6ライブラリーを測定する場合

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	STD −1	STD −1	STD −1	Lib x500	Lib x500	Lib x500	Lib x500	Lib x500	Lib x500	Lib x500	Lib x500	Lib x500
B	STD −2	STD −2	STD −2	Lib x1000	Lib x1000	Lib x1000	Lib x1000	Lib x1000	Lib x1000	Lib x1000	Lib x1000	Lib x1000
C	STD −3	STD −3	STD −3	Lib x2000	Lib x2000	Lib x2000	Lib x2000	Lib x2000	Lib x2000	Lib x2000	Lib x2000	Lib x2000
D	STD −4	STD −4	STD −4	Lib x4000	Lib x4000	Lib x4000	Lib x4000	Lib x4000	Lib x4000	Lib x4000	Lib x4000	Lib x4000
E	STD −5	STD −5	STD −5	Lib x500	Lib x500	Lib x500	Lib x500	Lib x500	Lib x500	Lib x500	Lib x500	Lib x500
F	STD −6	STD −6	STD −6	Lib x1000	Lib x1000	Lib x1000	Lib x1000	Lib x1000	Lib x1000	Lib x1000	Lib x1000	Lib x1000
G	NTC	NTC	NTC	Lib x2000	Lib x2000	Lib x2000	Lib x2000	Lib x2000	Lib x2000	Lib x2000	Lib x2000	Lib x2000
H				Lib x4000	Lib x4000	Lib x4000	Lib x4000	Lib x4000	Lib x4000	Lib x4000	Lib x4000	Lib x4000

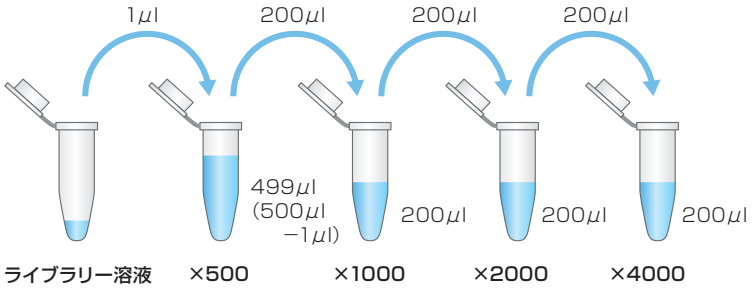
4. ライブラリーの段階希釈（500倍、1000倍、2000倍、4000倍）

1.5mlチューブを1ライブラリーあたり4本準備します。
それぞれにライブラリー希釈液を分注します。
「500μl」「200μl」「200μl」「200μl」

① 500倍希釈
500μlから1μl抜く

ライブラリー 1μl添加
ボルテックス

② 1000倍から4000倍まで順次希釈
500倍希釈液から、200μlを次のチューブ（1000倍希釈）へ移し、ボルテックス
3本目（2000倍）、4本目（4000倍）も同様に倍々希釈



＊リバースピペッティングでの分注を推奨します。
＊チップは都度、交換します。（リバースピペッティングによるチップ内の残液ごと廃棄します。）
＊分注する溶液は吐き出しのみで、ピペッティングミックスを行わずにボルテックスで混合します。
⇒ピペッティングミックスを実施すると、定量結果がバラつく原因となる可能性があります。

5. プレミックスの調製とqPCRプレートへの分注

＜反応組成＞

① KAPA SYBRR FAST qPCR Master Mix（以下を含む。）	12μl
• Primer Premix	
• ROX（装置により異なります。2ページ2）をご確認ください。）	
② PCR用精製水	4μl
③ テンプレート（ライブラリー/ライブラリー希釈液または水（NTC）/スタンダード）	4μl
計	20μl／ウェル

1）使用ウェルの計算

ライブラリー数1 ： 33ウェル（ライブラリー12 ＋ スタンダード18 ＋ NTC3）
ライブラリー数2 ： 45ウェル（ライブラリー24 ＋ スタンダード18 ＋ NTC3）
ライブラリー数3 ： 57ウェル（ライブラリー36 ＋ スタンダード18 ＋ NTC3）
ライブラリー数4 ： 69ウェル（ライブラリー48 ＋ スタンダード18 ＋ NTC3）
ライブラリー数5 ： 81ウェル（ライブラリー60 ＋ スタンダード18 ＋ NTC3）
ライブラリー数6 ： 93ウェル（ライブラリー72 ＋ スタンダード18 ＋ NTC3）

2）プレミックスの調製

ウェル数は上記必要ウェル数+αで計算し、少し多めにプレミックスを調製します。
2.0mlチューブに（マスターミックス12μl×ウェル数+α）と（水4μl×ウェル数+α）をボルテックスして混合します。

① Primer Premix を含むKAPA SYBR® FAST qPCR Master Mix	12μl ×（ウェル数+α）	チューブに混合
② PCR用精製水	4μl ×（ウェル数+α）	

3）qPCR用プレートへの分注

①+② プレミックス（上記の 2）で調製したもの）	16μlを分注
③ テンプレート（ライブラリー/ライブラリー希釈液または水（NTC）/スタンダード）	4μlを分注
計	20μl／ウェル

プレミックスは、各ウェルにあらかじめリバースピペッティングで連続分注しておくことを推奨します。
テンプレート溶液は、通常のピペッティングで追加分注します。チップは都度、交換します。
⇒ 分注する溶液はプレミックス溶液中への吐き出しのみで、溶液中でのピペッティングミックスは不要です。
ピペッティングミックスを実施すると、定量結果がバラつく原因となる可能性があります。
⇒ テンプレートでリバースピペッティングを実施してしまうと、チップを都度交換する毎にチップ中の残液を廃棄してしまうため、スタンダード溶液が不足してしまいます。
＊8連チューブに分注してから、8連ピペットでプレートに分注すると便利です。

6. qPCRの実施

qPCR用プレートシール（又はqPCR用クリアキャップ）で密封し、各装置の手順に従って、以下のサイクルプログラムでqPCRを実施します。
なお、qPCR装置で「絶対定量測定」を用い、スタンダードカーブ（検量線）、Ct値、測定濃度が算出できるように設定してください。

初期活性化／変性	95 ℃	5分	
変性	95 ℃	30秒	35サイクル
アニーリング／伸長／データ収集	60 ℃	45秒	

作成するライブラリーキットの取扱説明書を十分にご確認のうえ、Template Dilution Factorをどのように計算するか、以下の（1）～（3）から決定ください。（ライブラリーキット毎にemPCRに使用する推奨ライブラリー濃度が異なる場合があります。）

（1）リアルタイムPCRの定量結果から推奨濃度 “280×10^{6}分子/18μl” となるTemplate Dilution Factorを直接計算する場合

（2）リアルタイムPCRで定量したライブラリー濃度（nM）からTemplate Dilution Factorを換算する場合
（例）ライブラリー濃度（nM）から推奨濃度 “210×10^{6}分子/20μl” となるTemplate Dilution Factorを換算する場合
Template Dilution Factor=（ライブラリー濃度nM）×[（5×10^{9}分子/μl）/（8.3nM）]×[20μl/（210×10^{6}分子）]

（3）リアルタイムPCRで定量したライブラリー濃度（dsDNA分子/μl）からTemplate Dilution Factorを換算する場合

決定した方法により、qPCR装置のスタンダードカーブ（検量線）を下記の（1）～（3）から選択して作成します。

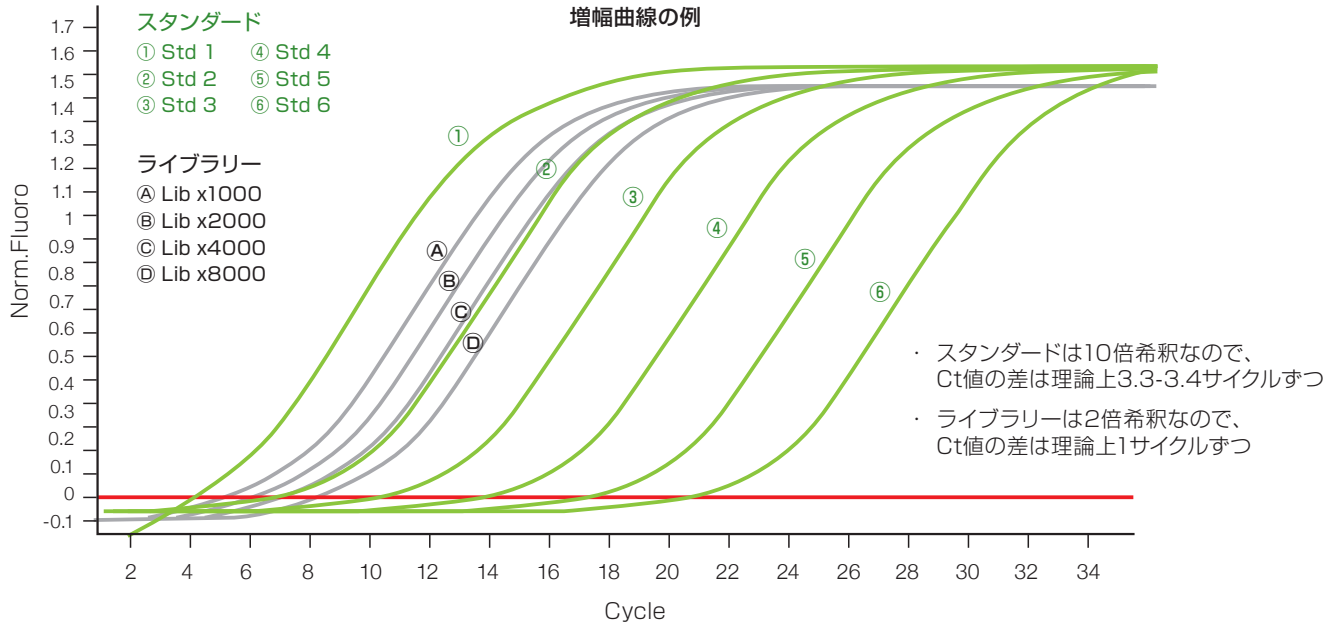
サンプル名	（1）Template dilution factor*		（2）nM		（3）dsDNA分子／μl
Std 1	3.2		0.083026943		50,000,000
Std 2	0.32		0.008302694		5,000,000
Std 3	0.032	または	0.000830269	または	500,000
Std 4	0.0032		8.30269E-05		50,000
Std 5	0.00032		8.30269E-06		5,000
Std 6	0.000032		8.30269E-07		500

*Template dilution factorの値は、最終的にemPCRに使用する推奨濃度 “280×10^{6}分子/18μl” となる希釈倍率を求められるように計算されています。

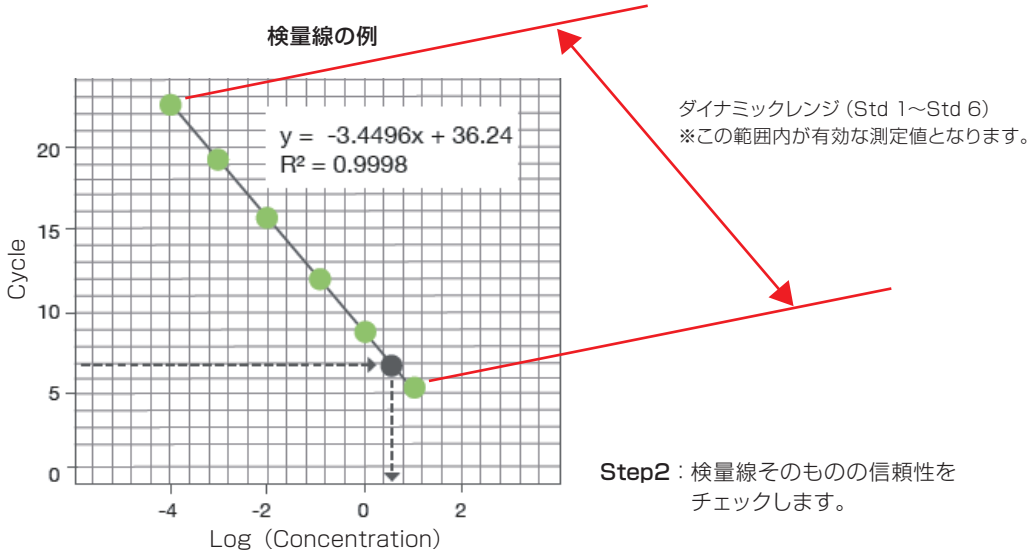
*この表の数値を、そのままqPCR装置のスタンダードカーブ（検量線）作成用に使用してください。
なお、表中スタンダード濃度は、バイアル中のスタンダード溶液の濃度になっております。
（詳しくは、英文の取扱説明書をご確認ください。）

7. qPCR結果の解析

KAPA Library Quantification Kitsによる絶対定量の概要



Step1：各qPCR装置のソフトウェアでスタンダードによる検量線を作成します。



Step2：検量線そのものの信頼性をチェックします。

Step3：各qPCR装置のソフトウェアでスタンダードとサンプルの「濃度」と「Ct値」を算出します。

Step4：各「Ct値」から、Kapa Efficiency Calculatorを用いてデータの信頼性をチェックします。

Step5：スタンダードとサンプルの長さの違いで補正係数を掛けてライブラリー濃度を算出します。

（詳細は次ページより）

(1) スタンダードによる検量線の作成

⇒ 各qPCR装置のソフトウェアで検量線を作成します。

⇒ 明らかな異常値と考えられるスタンダードは除外して再度検量線を作成します。

(2) 解析の準備 (用意するもの)

1) qPCRのデータ (tab区切りなどのtxtデータ):

各ウェルのサンプル名、Ct値、検量線から算出した各サンプルのDilution factor (またはライブラリー濃度)

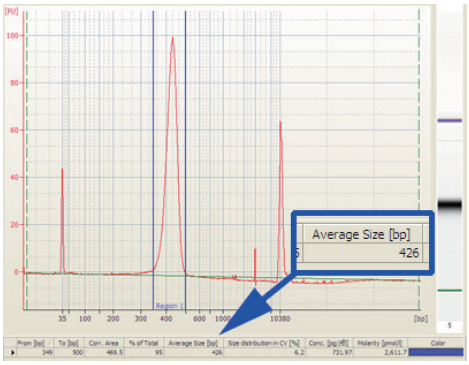
⇒ 各qPCR装置のソフトウェアで出力 (Export) します。

⇒ Excel等の表計算ソフトで、各スタンダードやライブラリーなどのCt値および濃度について、各3反復の平均値を算出しておきます。

2) 解析用ソフトウェア : Kapa Efficiency Calculator

⇒ 日本ジェネティクスWebからダウンロード可能です。

3) DNAライブラリーの平均サイズデータ (AgilentBioanalyzerなどで測定したデータ)



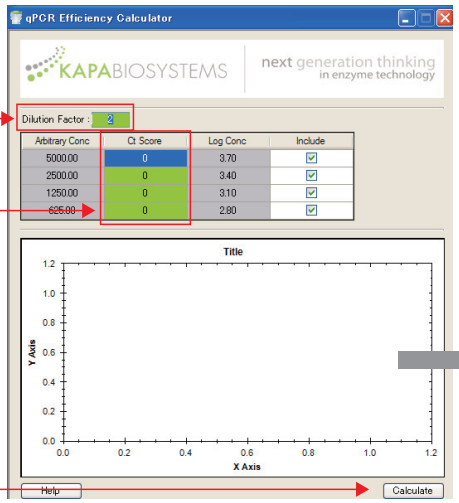
※2100 Expert ソフトウェアでレーンを選択し、Region Table タブでピークエリアを設定すると、Average Size[bp] 欄に平均サイズが表示されます。

(3) Kapa Efficiency Calculatorを用いて、reaction efficiencyをチェックします。
このチェックにより、qPCRで得られたデータの信頼性を確認します。

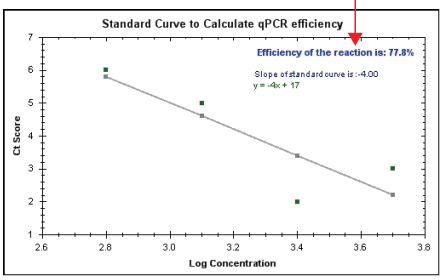
①希釈倍数を入力します。
<入力例>
スタンダード (10倍希釈) : 10
サンプル (2倍希釈) : 2

②得られた各Ct値 (3反復の平均値) を入力します。
(1セルずつコピー&ペーストも可能)

③" Calculate" ボタンを押します。



④表示された結果 (reaction efficiency) を確認します。



1) reaction efficiencyのチェックは、スタンダードおよび、各ライブラリー3濃度以上で実施ください。
reaction efficiencyが90 ~ 110%の範囲内になった結果のみを採用とします。

2) 3反復 (3ウェル) のうち、明らかな異常値はその値を棄却して、再チェックします。

⇒ スタンダードは10倍希釈なので、Ct値の差は理論上3.3-3.4サイクルずつ

⇒ ライブラリーは2倍希釈なので、Ct値の差は理論上1サイクルずつ

3) チェックの結果、、、

⇒ スタンダードのreaction efficiencyが範囲外 (<90%、>110%) となってしまった場合、
同一プレートで実施したライブラリー全てについて、再度qPCRにて測定することをお勧めします。

⇒ 個々のライブラリーでreaction efficiencyが範囲外 (<90%、>110%) となってしまった場合、
そのライブラリーについては再度qPCRにて測定することをお勧めします。

⇒ スタンダードで異常値として除外する場合には、qPCR装置のソフトウェアで
該当するスタンダードを除外したうえで、再度検量線を作成してください。
最終的に、この信頼性が高い検量線を用いて算出されたサンプルの濃度を再出力 (Export) してください。

(4) Excel等でTemplate Dilution Factor（またはライブラリー濃度）を計算をします。

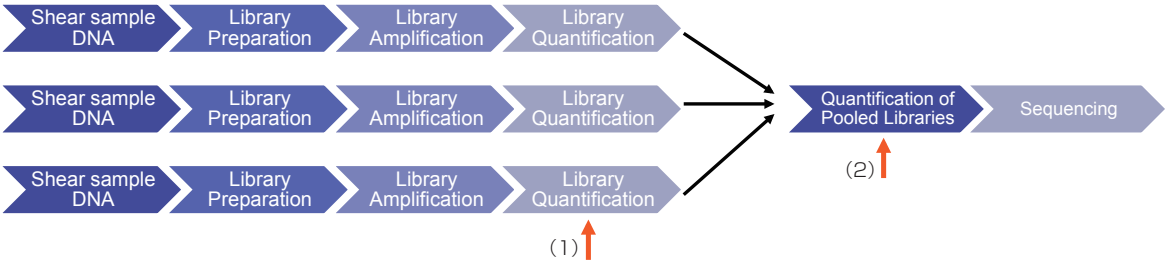
qPCR装置で算出されたTemplate Dilution Factor（ライブラリー濃度）は、サイズ153bpのスタンダードDNAを基準に算出された値となっているため、サイズ（bp）が異なるライブラリーでは、サイズ補正が必要となります。
そこで、取扱説明書のとおり、必ずライブラリー平均サイズで補正のうえ、Template Dilution Factor（ライブラリー濃度）を計算ください。

ライブラリー名	qPCR装置ごとに計算されたTemplate Dilution Factor（ライブラリー濃度）（3反復測定データポイント）			平均 Template Dilution Factor（ライブラリー濃度）	サイズ調整後 Template Dilution Factor（ライブラリー濃度）	保存ライブラリーの Template Dilution Factor（ライブラリー濃度）
ライブラリー 1：500	A1	A2	A3	A	$A\times\frac{153}{\text{Avg. fragment length}}=W$	W×500 ①
ライブラリー 1：1000	B1	B2	B3	B	$B\times\frac{153}{\text{Avg. fragment length}}=X$	X×1000 ②
ライブラリー 1：2000	C1	C2	C3	C	$C\times\frac{153}{\text{Avg. fragment length}}=Y$	Y×2000 ③
ライブラリー 1：4000	D1	D2	D3	D	$D\times\frac{153}{\text{Avg. fragment length}}=Z$	Z×4000 ④

・各希釈ごとの計算後のTemplate Dilution Factor（ライブラリー濃度）：上図①～④がほぼ一致することが理想です。
・ライブラリーを予備希釈した場合は、希釈倍率の計算にご注意ください。
・スタンダード検量線の**ダイナミックレンジ内に入っている最も希釈率の低いデータ**を採用します。
・ライブラリー濃度を定量結果として求めた場合、**ご使用のライブラリーキットで推奨されているTemplate Dilution Factorに換算してください。**
（例）ライブラリー濃度（nM）から推奨濃度“210×10⁶分子/20μl”となるTemplate Dilution Factorを換算する場合
Template Dilution Factor=（ライブラリー濃度nM）×[(5×10⁹分子/μl)/(8.3nM)]×[20μl/(210×10⁶分子)]
・最終的に求められたDilution factorのとおりライブラリーを希釈することで、emPCRに使用する推奨濃度が得られます。
例）“280×10⁶分子/18μl”となるTemplate Dilution Factorが457の場合
未希釈のライブラリー原液1μlを、456μlの希釈バッファー（PCR用精製水やLowTEバッファーなど）で希釈し、18μlをemPCRに使用します。

8. 補足：マルチプレックス解析の場合

マルチプレックス解析として、複数のライブラリーをミックスしてシーケンスする場合、以下の2段階でライブラリーの定量を実施します。
(1) 個々のライブラリーの定量　⇒ ライブラリーのミックスに添加する量を揃えるために定量します。
(2) ミックスしたライブラリーの定量 ⇒ 次世代シーケンサーへアプライするために定量します。



9. 補足：emPCRに使用する最適なTemplate Dilution Factor（ライブラリー濃度）について

本キットで得られたTemplate Dilution Factor（ライブラリー濃度）に基づき、emPCRに使用するライブラリー濃度を調整していくことで、より最適なシーケンス結果が得られるようになります。
このように、ご使用条件（次世代シーケンサーの種類、アプリケーションの種類、ライブラリー作成方法、等）毎に、emPCRに最適なライブラリー濃度を設定いただくことをお勧めいたします。

日本ジェネティクス株式会社 http://www.n-genetics.com

本　　社：〒112-0004　東京都文京区後楽1丁目4番14号 後楽森ビル18F　Tel. 03（3813）0961　Fax. 03（3813）0962
西日本営業所：〒604-8277　京都府京都市中京区西洞院通御池下ル565番地 ラフィーネ御池3F　Tel. 075（257）5421　Fax. 075（257）5422

10P1306